



ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
CLINICA FISIOLÓGICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
DIRETTORE: PROF. E. MORELLI

Dott. V. MACCONE

REAZIONI ALLERGICHE, LESIONI ANATOMICHE
E POTERE IMMUNITARIO DELLE CAVIE
TRATTATE CON BACILLI TUBERCOLARI MORTI
SOSPESI IN OLIO DI VASELINA

Estratto da ANNALI DELL'ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
Anno IV N. 11-12 Pag. 865-872



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
Via Emilio Morosini, 17

1940-XIX



REAZIONI ALLERGICHE, LESIONI ANATOMICHE E POTERE IMMUNITARIO DELLE CAVIE TRATTATE CON BACILLI TUBERCOLARI MORTI SOSPESE IN OLIO DI VASELINA (*).

Dott. VIRGILIO MACCONE

L'importanza della lesione locale nella genesi sia dell'allergia tubercolare come della resistenza all'infezione è stata studiata da tempo. Perchè si determinino sensibilizzazione alla tubercolina ed immunità è necessario che prodotti bacillari specifici giungano nell'organismo in stretto rapporto con elementi cellulari, probabilmente appartenenti al sistema reicolo-istiocitario. Tali prodotti possono essere costituiti da bacilli tubercolari vivi o morti, e perfino da frazioni chimiche diverse. Mezzi per accrescere il potere immunizzante di questi prodotti ne sono stati escogitati parecchi, anche di recente. Ma l'osservazione più antica a questo proposito è quella di VALLÉE, il quale, avendo notato in ricerche sui bovini per mezzo di un germe vivo di origine equina (per essi non patogeno) che la resistenza degli animali all'infezione durava finchè fossero ancora presenti nelle linfoghiandole i bacilli inoculati, considerò necessario, per ottenere una premunizione durevole in una malattia come la tubercolosi a decorso cronico, provocare una lesione locale da vaccino persistente, attiva e molto lentamente riassorbibile. A questo scopo iniettò i bacilli in sospensione in un miscuglio di grès porfirizzato o talco in olio di vaselina. Mentre inocolandoli in soluzione fisiologica otteneva nei bovini una lesione che guariva del tutto in tre mesi, quando li sospendeva in olio di vaselina si determinavano alterazioni persistenti per più di due anni.

Nel 1932 THOMPSON riferì di aver notato una sensibilizzazione assai spiccata con bacilli paratubercolari viventi in olio di paraffina. In seguito ai lavori di RAMON e collaboratori sul notevole aumento della produzione di antitossine quando l'antigene è iniettato insieme ad ecipienti grassi, COULAUD nel 1929 sperimentò la sospensione dei bacilli morti in olio di oliva e nel 1934 l'inclusione in paraffina pura. In ultimo SAENS nel 1935 e nei suoi molteplici lavori successivi tornò ad adottare l'olio di vaselina.

HENSEL riferì sugli ottimi risultati da lui ottenuti con la vaccinazione con germi uccisi sospesi in olio di vaselina praticata 10 e perfino 18 mesi prima dell'infezione di prova. FREUND, CASALS e HOSMER dimostrarono che sia nella cavia come nel coniglio e perfino nella scimmia l'aggiunta di piccole quantità d'olio di vaselina aumenta non soltanto l'ipersensibilità alla tubercolina ma anche il contenuto di anticorpi devianti il complemento.

(*) Comunicazione eseguita alla Sez. Laziale della Fed. It. Naz. Fasc. per la lotta contro la tubercolosi, nella seduta dell'8 aprile 1940-XVIII.

In Italia BROZZU nel 1933 sospese bacilli uccisi con formolo in olio di vaselina e notò una spiccata azione vaccinante del miscuglio.

Mi sono proposto di studiare se anche introducendo delle sospensioni di bacilli morti in questo veicolo per altre vie oltre quelle già saggiate da SAENZ (sottocutanea, intratesticolare, intrapolmonare) si avesse sviluppo di reazioni allergiche, di poteri di resistenza verso l'infezione tubercolare successiva, e quali lesioni anatomiche insorgessero nell'animale in seguito al trattamento vaccinante; confrontando queste diverse osservazioni con analoghe esperienze eseguite contemporaneamente adoperando come vaccino bacilli morti della stessa cultura sospesi in soluzione fisiologica.

Tecnica: bacilli Vallée cresciuti su Sauton da sei settimane, uccisi a 120° per venti minuti, essiccati in termostato, trituriati in mortaio e sospesi in olio di vaselina purissimo e sterile, nella quantità di 10 mg. di peso secco per cc. La stessa dose è sospesa per le cavie di controllo in soluzione fisiologica.

Vie di introduzione: sottocutanea, intradermica, endocerebrale, endospinale, intratesticolare, endovenosa. Purchè gli animali fossero abbastanza grossi e l'iniezione fatta molto lentamente nella quantità di 0,5 cc. per le vene e di 0,3 nell'interno del cranio o del cavo vertebrale, le cavie non mostravano disturbi immediati in seguito all'introduzione dell'olio di vaselina.

In tutte le cavie venne praticata ogni settimana intradermoreazione con 0,1 cc. di AT 1/5. La differenza fra i due gruppi è stata costante e nettissima: mentre quello trattato con bacilli in soluzione fisiologica diede risultati quasi sempre negativi (o debolmente positivi nelle cavie trattate soprattutto per via endotesticolare), tutti gli animali dell'altro gruppo offersero violente reazioni infiltrativo-emorragiche, di vari millimetri di diametro e di spessore, che regredivano lentamente; in un certo periodo (dopo 30 giorni circa) le stesse reazioni evolvevano in necrosi con formazione di escara. Di tutte più positive furono proprio le cavie trattate per via endovenosa.

Le lesioni locali determinate nelle cavie trattate con bacilli in olio apparivano diverse morfologicamente a seconda dell'organo iniettato. Nel sottocute, accessi freddi che in alcuni casi si svuotavano all'esterno con guarigione; nel derma, formazione di un nodulo di infiltrazione notevole che si ulcerava guarendo in circa due mesi; il testicolo era trasformato in questo torno di tempo in un ammasso necrotico pseudocaseoso; i polmoni delle cavie vaccinate per via endovenosa erano un mese dopo il trattamento grossi, consistenti, omogeneamente gialli con aspetto di pneumonite caseosa, che perdurava vari mesi, diventando in seguito variegati di chiazze rosee su fondo giallastro o di zone giallastre su fondo roseo, come di porfido; le cavie vaccinate per via endocranica o endospinale erano colpite entro due settimane da paralisi motorie che nelle superstìti regredivano in circa un mese; le meningi erano ispessite, congeste, granulose.

Negli animali trattati con la stessa dose di bacilli morti in soluzione fisiologica le lesioni locali erano invece minime o affatto assenti.

Nei polmoni di tutte le cavie vaccinate con eccipiente oleoso per varie vie oltre l'endovenosa, e uccise a varia distanza di tempo, ho costantemente osservato numerosissimi nodolini grigi o grigio-giallastri, grandi da una punta ad una testa di spillo, traslucidi che ricordavano perfettamente in taluni casi la tubercolosi miliare polmonare, in altri facevano assumere al viscere aspetto marmorizzato. Le ghiandole delle varie stazioni erano aumentate di volume e giallastre, gli altri organi in genere integri o al più con qualche chiazza dello stesso colore, superficiale, vitrea. Il legittimo sospetto che tali lesioni, anzichè da germi morti, fossero determinate da bacilli ancora viventi e virulenti, era nettamente escluso dalle prove colturali e dai trapianti in cavia eseguiti con questi organi, ricerche riuscite sempre negative.

Dei reperti microscopici dei vari organi espongono solo sinteticamente quelli riguardanti le alterazioni polmonari prodotte dai bacilli in veicolo oleoso, come quelli più importanti per lo scopo del mio lavoro.

In queste alterazioni il processo istopatologico è uniforme per qualunque via (meno la endovenosa) tale sospensione sia stata introdotta ma nello stesso polmone le lesioni sono in stadi di sviluppo relativamente abbastanza disparati. Tuttavia si possono ricostruire facilmente vari periodi dell'evoluzione in una scala in cui le prime alterazioni — quando all'esame diretto nulla appare di notevole — consistono in un discreto ispessimento della trama polmonare per diffusa proliferazione delle cellule interstiziali; in alcune zone tale proliferazione è più spiccata sì che gruppi di alveoli sono occupati da cellule grosse, rotonde, mononucleate, a nucleo ricco di cromatina, costituendo così dei noduli non ben delimitati dal restante parenchima, e dove la colorazione col Sudan III dimostra particolarmente abbondanti le gocce di olio di vaselina (fig. 1-2). Nella evoluzione ulteriore tali noduli, — di grandezza varia,

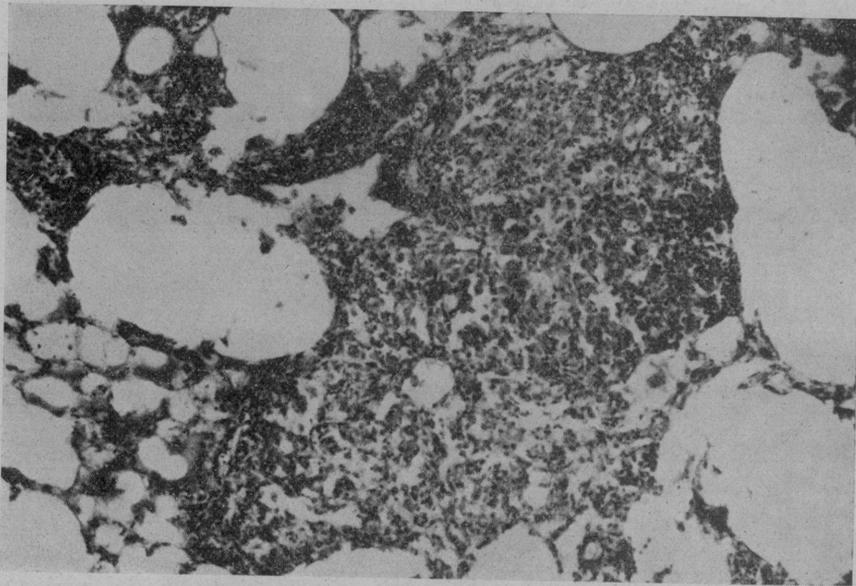


Fig. 1.

ma sempre notevole — assumono aspetto nettamente istiocitario e spesso sono circondati o compenetrati da cellule piccole, serrate, linfocitoidi (fig. 2). In seguito — generalmente alla fine del secondo mese — mentre la trama polmonare è tornata normale, i noduli hanno il centro costituito da cellule epitelioidei circondate da una corona istiocito-linfocitaria (fig. 3). Talora si hanno anche cellule giganti con nuclei centrali a tipo corpo estraneo (fig. 4). Se i bacilli paraffinati vengono immessi direttamente nelle vene il polmone si trasforma presto in un tessuto quasi compatto perchè gli alveoli sono occupati da grosse cellule mononucleate, rotonde, con parenchima abbondante e nucleo chiaro; l'aspetto cioè della pneumonite desquamativa (fig. 5). Dopo circa un mese si formano, in vicinanza di vasi di medio calibro, nodi coi caratteri già descritti e ben delimitati dal resto del tessuto così alterato. A quattro mesi dal trattamento si formano nel polmone vaste zone di tessuto di granulazione, derivante dalla confluenza di vari nodi, nell'interno dei quali si trovano numerose fibrille connettivali, indice di una evoluzione fibrosa (fig. 6).

Nelle cavie vaccinate con bacilli morti in soluzione fisiologica non ho invece mai constatato alterazioni istologiche del polmone, tranne che nel

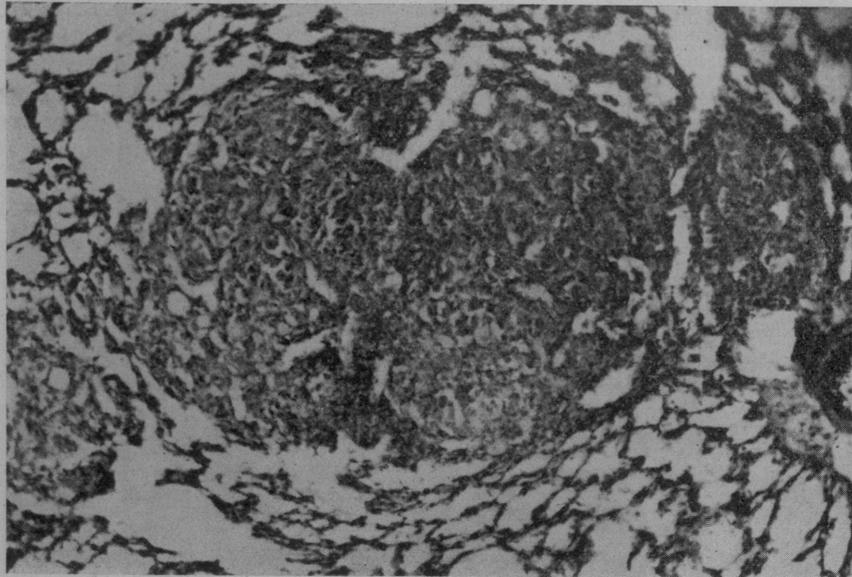


Fig. 2.

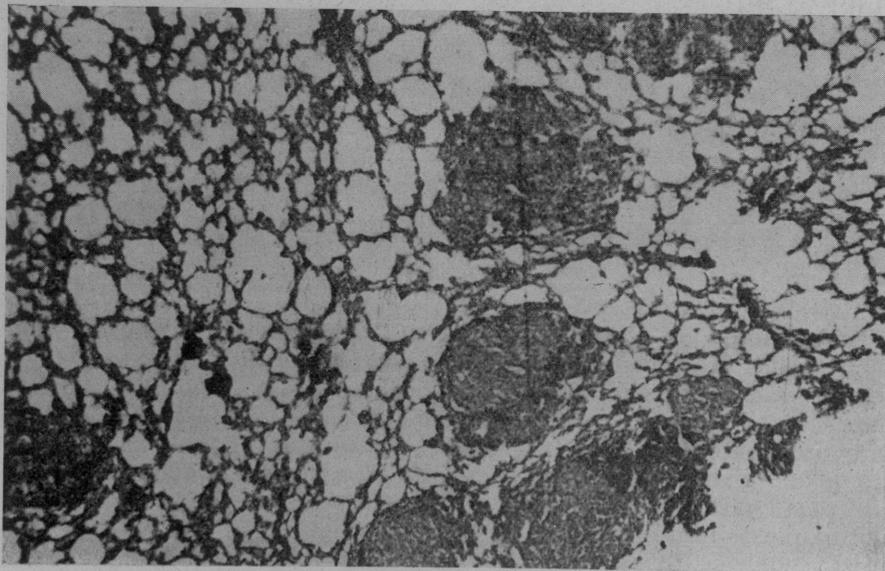


Fig. 3.

caso dell'inoculazione per via venosa, in cui si hanno nel primo mese scarsi tubercoli piccoli ed isolati e nodi di proliferazione dell'avventizia vasale, che regrediscono rapidamente.

Dopo 50 giorni dal trattamento un certo numero di cavie dei due gruppi (una dozzina per gruppo) furono infettate con 1/1000 di mg. di un ceppo umano

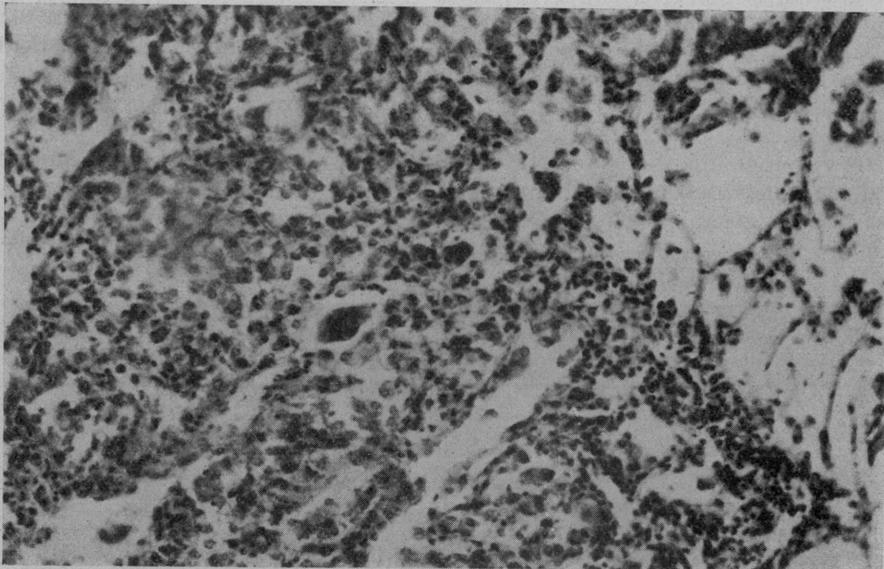


Fig. 4.

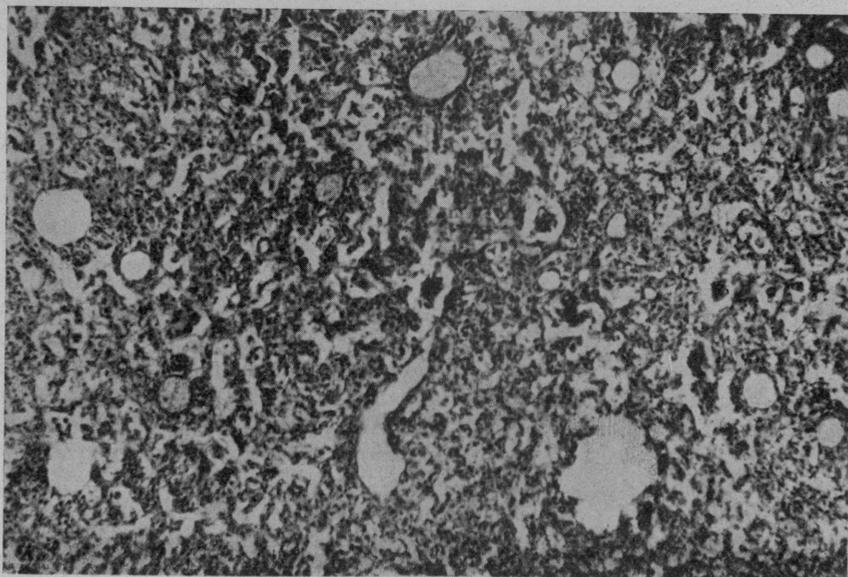


Fig. 5.

di laboratorio virulento, contemporaneamente a degli animali di controllo trattati soltanto con olio di vaselina puro e mantenuti per tutta la durata dell'esperienza nelle stesse condizioni di vitto e ambiente. Di questi animali

una metà venne uccisa 45 giorni e l'altra tre mesi dopo l'infezione. Nel primo gruppo mentre i controlli dimostravano lesioni delle ghiandole, della milza e qualche nodulino ai polmoni, gli animali vaccinati con germi in soluzione fisiologica avevano lesioni più scarse alla milza, ma nulla ai polmoni; gli altri trattati con germi in sospensione oleosa avevano lesioni caseose di tutte le ghiandole e qualche nodo alla milza. A 90 giorni dall'infezione quest'ultimo gruppo di cavie aveva ancora lesioni un po' meno avanzate delle altre.

Riassumo brevemente i fatti esposti per tentarne poi una eventuale interpretazione.

Le reazioni allergiche offerte dagli animali trattati con bacilli morti in olio di vaselina sono costanti, durevoli, precoci, intensissime, mentre con la stessa dose di germi in soluzione fisiologica si hanno risposte irregolari, scarse, fugaci.

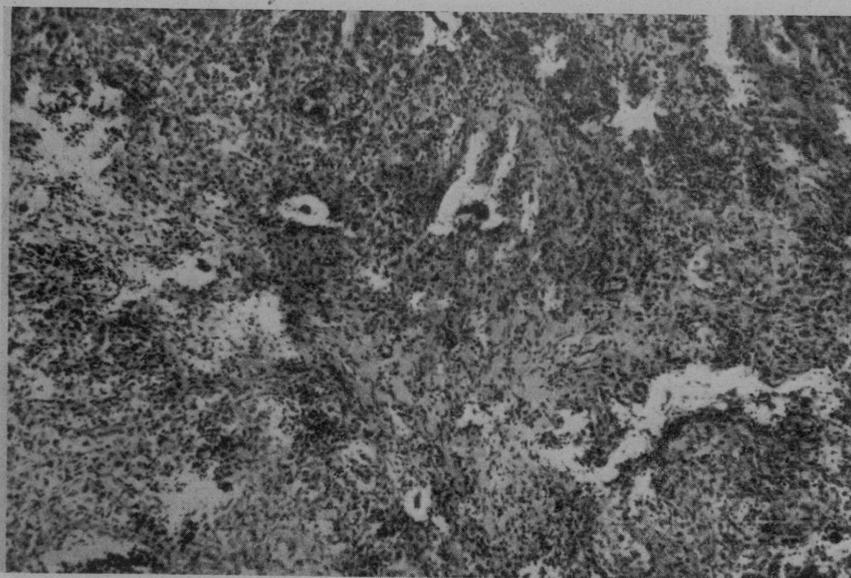


Fig. 6.

Mentre le lesioni specifiche da germi morti in soluzione fisiologica sono lievi e strettamente limitate al punto d'inoculazione, quelle determinate dalla sospensione oleosa sono più gravi, estese a distanza (ghiandole, polmone) e assai più durature. Anch'esse sono in ultima analisi rappresentate istologicamente da un'iperplasia specifica del sistema reticolo-endoteliale analoga a quella indotta dagli stessi germi in soluzione fisiologica, ma di grado notevolmente più accentuato.

La resistenza conferita alle cavie dal vaccino oleoso di fronte all'infezione di prova è poco spiccata, non molto superiore a quella prodotta dallo stesso vaccino in soluzione fisiologica, e si traduce in un leggero ritardo nella generalizzazione delle lesioni nei vari organi.

Si verifica così nelle cavie vaccinate con bacilli morti in olio una netta differenza fra la sensibilità alla tubercolina che è elevatissima al momento dell'infezione e la resistenza alla stessa, che è piccola e comunque neppure da lontano paragonabile all'aumento dell'allergia. Ciò dimostra ancora una volta che i due fenomeni sono diversi per natura e non sempre coincidenti. L'al-

lergia tubercolare può essere conferita anche dei bacilli morti, e costantemente, in grado accentuatissimo, se tali germi vengono sospesi in olio di vaselina. Se, come numerosi lavori sperimentali hanno messo in luce, l'allergia è conferita da costituenti bacillari che si riassorbono lentamente, continuamente, attraverso una reazione infiammatoria locale, questo sembrerebbe a prima vista spiegare i nostri risultati. Ma esperienze dello stesso SAENZ dimostrano che bacilli tubercolari vivi raggiungono nello stesso periodo di tempo le varie stazioni linfatiche, la milza, ecc., sia che vengano inoculati in soluzione fisiologica come in olio di vaselina. Non esiste dunque un ritardo nella dispersione del materiale sospeso in olio.

L'importanza — sostenuta da TYTLER — del focolaio infiammatorio locale come atto a modificare le proteine bacillari e a renderle sensibilizzanti potrebbe essere sostenuta nel nostro caso, dove è evidente la maggiore importanza dei fenomeni infiammatori provocati dai bacilli in olio, per quanto mie ricerche di controllo mi hanno rivelato che l'olio di vaselina puro riesce poco irritante per i tessuti.

Ma soprattutto è da tener presente il fatto importante che, mentre con bacilli uccisi in soluzione fisiologica non si hanno lesioni metastatiche, queste sono la regola nel caso del vaccino oleoso. A spiegare questo fenomeno soccorrono le esperienze di MUDD e MUDD, le quali dimostrano come tutti i germi acidoresistenti hanno una particolare affinità fisico-chimica per il mezzo oleoso che abbandonano difficilmente e in cui emigrano se posti in condizioni di scegliere fra due fasi, una oleosa e l'altra acquosa. Questa esperienza, che ho ripetuto, e le ricerche di controllo sulle cavie inoculate con olio di vaselina puro, che mi hanno provato come questo si riassorba per via linfatica e poi dal canale toracico entri nel circolo generale, spiegano perchè i bacilli morti in vaselina emigrino dal punto di inoculazione attraverso i gangli fino nei polmoni, determinandovi focolai metastatici. È allora possibile ammettere che la maggior estensione della superficie di contatto fra i bacilli e i tessuti così ottenuta e il lento continuo riassorbimento di questi focolai siano condizioni capaci di provocare l'aumento della reazione allergica, analogamente a quanto avviene nell'infezione con bacilli vivi, che si moltiplicano e si diffondono, aumentando così le superfici e prolungando la durata del contatto fra germi e tessuti.

Per quanto riguarda la questione dell'immunità goduta dalle cavie vaccinate con germi in olio, devo notare che la dose dell'infezione di prova da me usata è stata troppo elevata perchè fosse possibile mettere in evidenza altro che un lieve ritardo della diffusione delle lesioni, cioè un grado alquanto modesto di resistenza: necessitano perciò nuove esperienze — già in corso — per illustrare meglio questo lato del complesso argomento.

RIASSUNTO

L'autore ha eseguito esperienze sulla ipersensibilità alla tubercolina e sulla resistenza all'infezione conferita a cavie per mezzo della vaccinazione con bacilli morti sospesi in olio di vaselina e inoculati per diverse vie (endovenosa, endocranica, endospinale). Descrive anche particolarmente i reperti istologici delle alterazioni metastatiche polmonari determinate da questo trattamento. Illustra i dati ottenuti — notevole aumento dell'allergia, scarsa resistenza acquisita — e ne tenta l'interpretazione.

RÉSUMÉ

L'A. a fait des expériences sur la hypersensibilité à la tuberculine et sur la résistance à l'infection conférée aux cobayes par vaccination avec des bacilles de Koch morts et suspendus en huile de vaseline, inoculés par voies différentes (intraveineuse, intraspinale, intracrânienne).

Il fait aussi une description histologique particulière des altérations métastatiques pulmonaires provoqués par ce traitement.

Enfin il fait un rapport sur les résultats obtenus (augmentation considérable de la réactivité allergique, faible résistance acquise), et il essaye d'en donner une interprétation.

SUMMARY

The author has carried out experiments in guinea-pigs to the hypersensitivity to tuberculin and the resistance to infection conferred by means of dead bacilli suspended in vaseline oil and inoculated endovenously, endocranially and endospinally. The histological findings of metastatic alterations of the lung determined by this treatment are described. The data obtained are then illustrated noteworthy allergic augmentation, scarce resistance acquired of which an interpretation is offered.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verf. hat mit abgetöteten in Vaselineöl aufgeschwemmten Tuberkelbazillen Meerschweinchen in verschiedeneth Weise (intravenös, intrakranial, intraspinal), behandelt und deren Tuberkulinempfindlichkeit und Infektionsresisten geprüft. Er beschreibt hauptsächlich den histologischen Befund der metatischen Lungenveränderungen die durch diese Behandlung hervorgerufen werden. Er legt die eehaltene Befunde dar — erhebliche Vernochrung der Allergie, schwache erworbene Widerstandsfähigkeit — und versucht deren Grundlage zu erläutern.

BIBLIOGRAFIA

- BROTZU. — « Boll. Sez. It. Soc. Internaz. Microbiol. », 289; 1933.
 COULAUD E. — « Rev. de la tub. », 10, 430; 1929; *ibidem*, 2, 850; 1934.
 FREUND J., CASALS J., HOSMER E. P. — « Proc. Soc. Exp. Biol. Med. », 37, 509; 1937.
 FREUND J. e CASALS J. — « J. of Immun. », 36, 399; 1939.
 HENSEL G. — « Beitr. Klin. Tbk. », 90, 26; 1937; *ibidem*, 91, 442; 1938.
 MUDD S. e MUDD E. B. H. — « I. exp. Med. », 40, 747; 1924.
 SAENZ A. — « C. R. Soc. Biol. », 120, 870 e 1050; 1935; *ibidem*, 122, 911 e 1561; 1936;
ibidem, 124, 338, 415 e 1161; 1937.
 ID. — « Ann. Inst. Pasteur », 60, 58; 1938.
 THOMPSON H. M. — « Am. Rev. Tbc. », 26, 162; 1932.
 TYTLER. — « System of Bacteriology » 1930.
 VALLÉE H. — « C. R. Acad. Sciences », 178, 152; 1924.
 ID. — « Rev. gén. Méd. vét. », 33, 1; 1924.

59676



